



TITLE:

Verification and rectification of cell type-specific splicing of a Seckel syndrome-associated ATR mutation using iPS cell model(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ichisima, Jose

CITATION:

Ichisima, Jose. Verification and rectification of cell type-specific splicing of a Seckel syndrome-associated ATR mutation using iPS cell model. 京都大学, 2019, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2019-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22006>

RIGHT:

許諾条件により本文は2019-11-01に公開; Authors should cite the publication reference and DOI number on the first page of any deposited version, and provide a link from it to the URL of the published article on the journal's website.

京都大学	博士（ 医科 学）	氏 名	市 島 ホ セ
論文題目	Verification and rectification of cell type-specific splicing of a Seckel syndrome-associated ATR mutation using iPS cell model （ iPS 細胞モデルを用いたセッケル症候群関連 ATR 遺伝子変異の細胞種特異的スプライシングの確認及び矯正）		
（論文内容の要旨）			
<p>セッケル症候群(Seckel syndrome：SS)は小頭症、脳回形成異常、低身長、成長障害及び精神遅滞などの症候を呈する希少な先天性疾患である(Khetarpal, P. et al. 2016 Mol. Gen. Genet.)。SS の小頭症においては、脳回の単純化が見られるものの、大脳皮質の層構造は正常に形成される。そのため、小頭症の細胞学的な原因は脳を構成する神経細胞になる神経前駆細胞集団の枯渇によるところが大きいとされる。近年、SS の原因遺伝子として DNA 修復関連遺伝子や中心体形成遺伝子が複数同定され、細胞学的特徴として複製ストレス応答の減少や中心体の異常形成に伴う分裂異常が見られるものの(Mark O’ Driscoll et al. 2003 Nat. Genet.; Sir et al. 2011 Nat. Genet.)、これらの遺伝子の多くはユビキタスな発現が認められ、神経系へ特に大きい影響をもたらす理由は不明である。</p> <p>SS の原因遺伝子の一つである <i>ATR</i> 遺伝子は複製ストレスや DNA 修復応答の際に働く主要なキナーゼとして広く知られる。最初に同定された SS 関連の遺伝子変異である <i>ATR</i> 遺伝子の 2101 A>G 変異(Mark O’ Driscoll et al. 2003 Nat. Genet.) は <i>ATR</i> 遺伝子エキソン 9 のスキッピングを引き起こし、ATR タンパク質の低下を誘発する。しかしヒトの神経前駆細胞(NPCs)でこの遺伝子変異の挙動とその影響は確認されていない。そこで <i>ATR</i>2101 A>G 変異を有する線維芽細胞より SS 患者由来人工多能性幹細胞（SS-iPSCs）を樹立し、さらに遺伝子変異を修復した株(cSS-iPSCs)を作製した。SS-iPSCs を用いてNPCs をはじめ、複数の細胞種においてエキソン 9 のスプライシングパターンを検証した。RT-PCR 法でスプライシングを解析したところ、患者由来線維芽細胞と同様に、SS-iPSC 株由来 NPCs (SS-NPCs)はスプライシング異常を示していた。しかし SS-iPSCs および SS-iPSC 株由来胚体内胚葉細胞ではエキソン 9 のスキッピングが減少し緩和されていた。</p> <p>網羅的な遺伝子発現解析を行うと、SS-NPCs は <i>ATR</i> 2101 A>G 変異を持たない株由来のNPCs と異なったプロファイルを示した。さらに Gene set enrichment analysis を行ったところ、神経形成関連遺伝子群の発現が低下していた。細胞学的表現型として SS-NPCs は修復株由来 NPCs と比較して紡錘体形成障害の頻度が上昇し、ニューロスフェア内部の外層にあるNPCs の並列に乱雑さが増していた。</p> <p>最後に、SS-NPCs にスプライシング制御薬を処理し、スプライシングを矯正する化合物を選別した。その結果、CLK1 阻害剤である TG003 が SS-NPCs おいてエキソン 9 のスキッピングを抑えることが確認された。さらに TG003 の処理によって SS-NPCs に見られる ATR のタンパク質の量の低下が回復し、そのリン酸化活性が上昇した。ならびに、紡錘体形成異常の頻度が TG003 によって下がることがみられた。</p> <p>これらの結果は SS-iPSC 株モデルの有用性を示し、<i>ATR</i> 2101 A>G 変異の細胞種特異的スプライシング及び SS-NPCs の分裂への作用を明らかにした。そして SS-NPCs にスプライシング制御薬を用いることでこれらの表現型が緩和された。現在までに <i>ATR</i> 遺伝子変異とのスプライシング障害との関連が言われてきたが、実際にヒトのNPCs においてスプライシングのふるまいが明らかにされていなかった。本論文で言及したように <i>ATR</i> 2101 A>G 変異はスプライシング細胞種特異性を示していることから、異なった分化段階や神経系細胞のサブタイプでの解析により SS の細かな病態解明に繋がると考えられる。</p>			

（論文審査の結果の要旨）
セッケル症候群(Seckel syndrome：SS)は小頭症、低身長などの症候を示す希少疾患である。SS の原因遺伝子として DNA 修復関連遺伝子などが同定されているが、神経系に大きい影響をもたらす理由は不明である。SS の原因遺伝子の一つである <i>ATR</i> 遺伝子は複製ストレスや DNA 修復に関与する。その遺伝子変異である <i>ATR</i> 2101 A>G 遺伝子変異は線維芽細胞でスプライシング異常を引き起こし、タンパク量の低下を誘発することが知られているが、ヒトの神経前駆細胞(NPCs)でこの遺伝子変異の挙動とその影響は確認されていない。この変異を有する SS 患者由来線維芽細胞より人工多能性幹細胞（SS-iPSCs）を樹立し、さらに遺伝子変異を修復した株(cSS-iPSCs)を作製し、解析を行った。スプライシング解析の結果、興味深いことに SS-iPSCs および SS-iPSC 株由来胚体内胚葉細胞ではスプライシング異常が緩和されていた。それに対して SS-iPSC 株由来 NPCs (SS-NPCs)は強いスプライシング異常を示していた。網羅的な遺伝子発現解析を行うと、SS-NPCs は cSS-NPCs と比べて神経形成関連遺伝子群の発現が低下していた。細胞学的表現型として SS-NPCs は修復株由来 NPCs と比較して紡錘体形成障害の頻度が上昇し、ニューロスフェア内部の外層にあるNPCs の核の配置に乱雑さが増していた。SS-NPCs のスプライシング異常を矯正する化合物の探索に成功した。CLK1 阻害剤である TG003 が SS-NPCs においてスプライシング異常を回復できた。また CLK1 阻害剤の処理によって SS-NPCs に見られる ATR のリン酸化活性の低下および紡錘体形成異常が回復した。
以上の研究は SS 患者に見られる遺伝子変異の挙動と影響の解明に貢献し、スプライシング異常を伴う疾患の解析モデル研究の進展に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（ 医科学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 3 月 27 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日以降